

Über den Einfluß von Doxycyclin bei gleichzeitiger
Gabe von Ethinylestradiol auf ausgewählte
Stoffwechselfparameter der Leber weiblicher Mäuse

Diss. Erlangen
1983

von
Klaus Schrader
aus
Hof





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie

der Universität Erlangen - Nürnberg

Vorstand: Professor Dr. C.-J. Estler

Über den Einfluß von Doxycyclin bei gleichzeitiger
Gabe von Ethinylestradiol auf ausgewählte
Stoffwechselfparameter der Leber weiblicher Mäuse

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Friedrich - Alexander - Universität

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Klaus Schrader

aus

Hof

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen.

Dekan: Prof. Dr. V. Becker

Referent: Prof. Dr. C.-J. Estler

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.1983

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis:

A. Einführung	S. 1
1. Pharmakologie von Doxycyclin	S. 1
1.1. Charakterisierung	S. 1
1.2. Wirkungsweise, Nebenwirkungen und Toxizität	S. 2
2. Pharmakologie von Ethinylestradiol	S. 4
2.1. Chemische Eigenschaften	S. 4
2.2. Extragenitale Wirkungen, Nebenwirkungen	S. 5
3. Indikatoren für eine Leberschädigung	S. 6
B. Methodik	S. 9
1. Versuchstiere	S. 9
2. Verwendete Testsubstanzen	S. 9
3. Vorversuch	S. 9
4. Hauptversuch	S. 10
4.1. Durchführung	S. 10
4.2. Gewinnung des Untersuchungsmaterials	S. 11
4.3. Testprinzipien der durchgeführten klinisch- chemischen Bestimmungen	S. 11
4.4. Qualitätskontrolle	S. 15
4.5. Statistische Auswertung	S. 15
C. Ergebnisse	S. 16
1. Vorversuch	S. 16
2. Hauptversuch	S. 16
2.1. Relatives Lebergewicht	S. 16
2.2. Wassergehalt der Leber	S. 17
2.3. Glutamat-Oxalat-Transaminase im Serum	S. 17
2.4. Glutamat-Pyruvat-Transaminase im Serum	S. 17
2.5. Alkalische Phosphatase im Serum	S. 18
2.6. Serum-Harnstoff	S. 18
2.7. Serum-Cholesterinspiegel	S. 19
2.8. Cholesteringehalt der Leber	S. 19
2.9. Triglyzeridgehalt des Serums	S. 19
2.10. Triglyzeridgehalt der Leber	S. 20



Abbildungen 1 - 15	S. 21
D. Diskussion	S. 34
1. Ethinylestradiol	S. 34
2. Doxycyclin	S. 35
3. Kombinierte Behandlung mit Doxycyclin und Ethinylestradiol	S. 36
E. Zusammenfassung	S. 38
Literaturverweise	S. 40

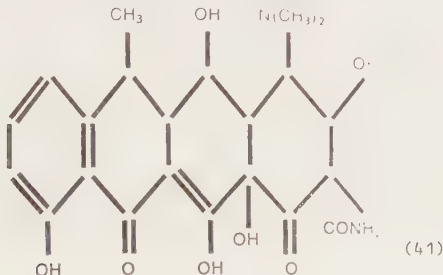
A. Einführung

1. Pharmakologie von Doxycyclin

Die Einführung der Stoffklasse der Tetracycline in die Chemotherapie nach 1945 eröffnete ähnlich wie bei den Penicillinen eine neue Ära in der Behandlung bakterieller Infektionen. Gute orale und parenterale Wirksamkeit, relativ gute Verträglichkeit (47) und ein breiteres Wirkungsspektrum als bei fast allen damals bekannten Antibiotika (62) sicherten ihnen jahrzehntelang eine hervorragende Rolle unter den antibakteriell wirksamen Substanzen. Durch eine weltweite Zunahme tetracyclinresistenter Bakterienstämme und die Entwicklung neuer Chemotherapeutika sind allerdings die Indikationen für Tetracycline heute begrenzter geworden. Nur noch selten sind sie Mittel der ersten Wahl (10, 28, 33, 35).

1.1. Charakterisierung

Alle Tetracyclinderivate sind Abkömmlinge des Naphthacens. Sie besitzen somit alle eine ähnliche chemische Struktur und unterscheiden sich nur durch die Art der Substituenten, die u.a. pH-Stabilität, Löslichkeit etc. bestimmen. In ihrer antibakteriellen Aktivität bestehen weitgehende Gemeinsamkeiten, in den pharmakokinetischen Eigenschaften besitzen die neueren, ab 1962 eingesetzten lipophileren Derivate wie das Doxycyclin gewisse Vorteile (29). Die Strukturformel von Doxycyclin ist nachstehend wiedergegeben:



1.2. Wirkungsweise, Nebenwirkungen und Toxizität

Tetracycline hemmen die Proteinsynthese in eu- und prokaryotischen Zellen durch Behinderung der t-RNA-Anlagerung an die 30S- respektive 40S-Untereinheit der Ribosomen, wobei die Affinität der Tetracycline zu Ribosomen von Bakterien höher ist als die zu Ribosomen von Säugern (9). Dieser Proteinkatabolismus und die außerordentliche Fähigkeit der Tetracycline, mit verschiedenen Ionen Chelatkomplexe zu bilden (1), erklären ihre bakterio-statische Wirkung ebenso wie die Nebenwirkungen.

Doxycyclin hat im Gegensatz zu anderen Tetracyclinen eine nur gering ausgeprägte Neigung zur Komplexbildung mit Ca-Ionen (49). Das erlaubt eine vergleichsweise niedrige Dosierung und ist ein wesentlicher Grund für die niedrige Nebenwirkungsrate. Die gegenüber anderen Tetracyclinen bis zu zehnmal höhere Lipoidaffinität (50) ist für die Verteilung im Körper von Bedeutung. So ist z.B. die Konzentration von Doxycyclin in Leber und Galle bis zu fünfmal höher als die erreichbaren Serumspiegel (13), in der Gallenblase können als Folge der Konzentrierungsvorgänge bis zu 15mal höhere Werte gemessen werden (14). Bei den Nebenwirkungen stehen gastrointestinale Störungen und Schleimhautreizungen im Vordergrund. Allergien, Photodermatosen und Stoffwechselstörungen werden selten beobachtet. Die Komplexbildung mit Ca-Ionen kann bei Säuglingen und Kleinkindern bis zum dritten Lebensjahr zu einer Beeinträchtigung der Dentition mit irreversibler Gelbverfärbung der Zähne führen (63). Auf diese unerwünschten Wirkungen der Tetracycline soll hier nicht weiter eingegangen werden, doch soll die Hepatotoxizität dieser Antibiotika Gegenstand näherer Betrachtung sein.

Tetracycline können eine Leberverfettung, u.U. sogar Leberzellnekrosen induzieren. GEROK und SICKINGER (19) sehen die Ursache dafür in einer Hemmung der oxidativen Phosphorylierung der Leber mit Abnahme der verfügbaren Energiespeicher und Einschränkung der energieabhängigen Triglyceridoxidation und/oder der Abnahme der VLDL-Lipoproteinsynthese mit verminderter Ausschleusung von Triglyceriden aus der Leber. Daß diese oft tödlichen Zwischenfälle einer Tetracyclinbehandlung, die in Europa extrem selten beobachtet werden, sich vornehmlich in den USA

ereigneten, erklärt WILDHIRT (65) mit der in den Vereinigten Staaten zeitweise üblichen vergleichsweise hohen Dosierung dieser Pharmaka von 10 - 15 g/Tag, das sind ca. 140 -200 ug/g Körpergewicht. Gefährdet erscheinen besonders Personen mit herabgesetzter Nierenfunktion aufgrund der Kumulationsneigung für bestimmte Tetracycline. Es fällt auf, daß vor allem bei Graviden und Frauen mit einem erhöhten Oestrogenspiegel Zeichen einer Leberschädigung durch Tetracycline beobachtet wurden. So berichten SCHULTZ u. Mitarb. (54) über Patientinnen, die während der Schwangerschaft wegen einer Pyelonephritis mit Tetracyclin behandelt wurden. Alle entwickelten eine Leberverfettung, die sich von der von SHEEHAN (56) beschriebenen Schwangerschaftsleberverfettung unterschied. Die gleichen Symptome einer Leberverfettung mit -nekrose beobachteten auch DAVIS (11), WHALLEY (64) und KUNELIS u. Mitarb. (32). Letztere warfen folgende Fragen auf:

- Gibt es während der Schwangerschaft eine erhöhte Empfindlichkeit der Leber für proteinkatabole Substanzen?
- Begünstigt eine bestehende Pyelonephritis in der Gravidität eine Leberverfettung?
- Welche Rolle spielen dabei die Tetracycline?

Leberverfettung und Leberzellnekrosen nach Tetracyclinbehandlung wurden durch LEPPER (36) allerdings auch an nichtschwangeren Frauen beobachtet.

Systematische tierexperimentelle Untersuchungen von BREEN u. Mitarb. 1972 und 1975 (4,5) sowie BÜCKER u. Mitarb. 1981 und 1982 (2,3) haben aufgezeigt, daß die tetracyclininduzierten Leberschäden sich im Tierversuch reproduzieren lassen und daß ähnlich wie beim Menschen auch bei Mäusen weibliche Individuen von tetracyclininduzierten Leberschäden quantitativ und qualitativ stärker betroffen werden als männliche. Steatose und Transaminasenanstieg stehen bei den hepatotoxischen Wirkungen im Vordergrund, während Leberzellnekrosen nicht beobachtet werden konnten. Dies steht in Übereinstimmung mit den Forschungsergebnissen von KERRY u. Mitarb. (26).

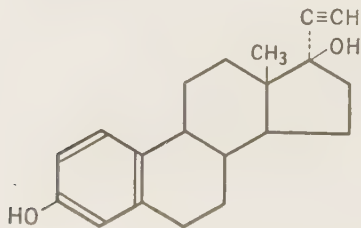
Die Vielfalt der geschilderten Beobachtungen deutet auf ein komplexes Interaktionsgeschehen zwischen Oestrogenen und Tetracyclinen hin. Dies

veranlaßte uns, im Tierversuch mit geschlechtsreifen weiblichen Mäusen den Einfluß von Ethinylestradiol auf die Wirkung eines Tetracyclinderivats, des Doxycyclin, auf ausgewählte Parameter des Leberstoffwechsels zu untersuchen. Ziel der Arbeit war einmal, einen Aufschluß darüber zu bekommen, ob zwischen Doxycyclin und Ethinylestradiol ein Synergismus in Bezug auf ihre hepatotoxische Wirkung besteht, zum anderen die Beantwortung der Frage, ob sich Doxycyclin und Ethinylestradiol in ähnlicher Weise in ihrer Wirkung auf den Stoffwechsel der Leber beeinflussen wie Tetracyclin und Ethinylestradiol, das in analogen Studien von FEINER (16) und SCHRAMM (53) untersucht wurde. Als Hormonomimetikum wurde Ethinylestradiol nicht zuletzt deshalb für unsere Versuche verwendet, weil es als Bestandteil der meisten Antikonceptiva und vieler anderer oestrogenhaltiger Präparate überragende Bedeutung für die Praxis genießt.

2. Pharmakologie von Ethinylestradiol

2.1. Chemische Eigenschaften

Ethinylestradiol wurde 1938 aufgrund der Forschungen von INHOFFEN und HDHLWEG (23) als oral applizierbares Oestrogenderivat in die Therapie eingeführt. Es besitzt folgende Strukturformel:



(42)

Durch die Alkyl-Substituierung an C-17 in α -Stellung sind die für eine Metabolisierung wichtigen Positionen C-16 und C-17 den inaktivierenden Leberenzymen nicht zugänglich. Ethinylestradiol hat deshalb eine im Vergleich zu den natürlichen Oestrogenen vier- bis fünfmal längere Halbwertszeit im Organismus von 35 Stunden und eine sehr feste Bindung an die Rezeptoren der Zielorgane.

2.2. Extragenitale Wirkungen, Nebenwirkungen

In seiner Wirkung gleicht Ethinylestradiol den anderen natürlichen und synthetischen Oestrogenen weitgehend. In Bezug auf die o.g. Fragestellung ist von Bedeutung, daß Ethinylestradiol auch extragenitale Wirkungen besitzt, von denen in diesem Zusammenhang diejenigen auf den Leberstoffwechsel besonders interessant sind.

Durch eine Beeinflussung der wichtigsten Leberfunktionen kann Ethinylestradiol wie auch andere Oestrogene sowohl den Protein- als auch den Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel stören. So hat es eine anabole Wirkung, die sich in einer Steigerung der Synthese von DNA, RNA und Gesamtproteinen einschließlich der Enzyme, in einer vermehrten Lipidbildung und einem beschleunigten Stoffwechsel der Kohlenhydrate in der Leber äußert (34). CHAO u. Mitarb. (7) fanden im Tierversuch bei Ratten, die mehrere Tage mit 5 µg Ethinylestradiol/g Körpergewicht behandelt worden waren, eine Hypolipidämie, wobei der Quotient HDL/LDL zunahm. Bereits 1937 konnten THORN und HARROP (58) den wasser- und natriumretinierenden Effekt der Oestrogene bei Hunden nachweisen. GALLAGHER u. Mitarb. (18) stellten bei Ratten nach einer mehrtägigen Behandlung mit 1 µg Estradiol/g KG eine signifikante Erhöhung des Lebergewichts fest. COLE u. SWEENEY (8) konnten bei männlichen Ratten nach mehrwöchiger oraler Verabreichung von 5 µg/g KG synthetischer Oestrogene Schwellungen der Hepatozyten und deren Organellen, teilweise auch Nekrosen beobachten. Auftretende Membranveränderungen der Leberzellen erinnerten die Autoren an Regenerationsstadien bei einer Leberzirrhose. OCKNER (44) bei Frauen und KONTURRI (30) bei wegen eines Prostatakarzinoms mit Oestrogenen behandelten Männern konnten in mehreren Fällen einen deutlichen

Anstieg der Serum-Transaminasen verzeichnen. Oestrogene besitzen einen wesentlichen Einfluß auf Bildung, Zusammensetzung und Transport der Galle sowie den Transport zahlreicher Substanzen in der Galle. MÜLLER (39) fand bei klinischen Untersuchungen in 30 - 50 % der Fälle ein Ansteigen der Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Serum nach Estradiolbehandlung mit 5 - 200 mg/Tag. Experimentelle Untersuchungen an Ratten, die über Tage mit 5 µg Ethinylestradiol/g KG behandelt wurden, zeigten eine deutliche Reduzierung des Galleflusses (22). Diese Beobachtung konnte von JAVITT (24) für die Klinik bestätigt werden. TRITAPEPE u. Mitarb. (59) konnten aufzeigen, daß diese Wirkung dosisabhängig ist. Weibliche Mäuse erhielten dabei in verschiedenen Versuchsgruppen zwischen 0,5 und 5 µg Ethinylestradiol oral über einen Zeitraum von 10 Tagen verabreicht. Die Autoren fanden eine lithogene Galle mit dosisabhängig mehr oder weniger starker Neigung zur Cholestase. In einer anderen Studie beobachtete TRITAPEPE (60), daß bei Ratten, die über 5 Tage je 5 µg Ethinylestradiol/g KG oral appliziert bekamen, sich der Gallefluß sieben Tage nach der letzten Behandlung wieder normalisiert hatte. Er schloß daher auf eine nur transiente Schädigung der gallesezernierenden Organellen der Hepatozyten durch Ethinylestradiol. Oestrogene stimulieren schließlich die delta-Aminolaevulinsäuresynthetase und Cytochrom P-450, wodurch die Bildung von Porphyrinen und die Häm synthese gefördert werden (25)

Aufgrund dieser Wirkungen liegen Interaktionen von Ethinylestradiol und Doxycyclin im Sinne einer gegenseitigen Wirkungsverstärkung deshalb durchaus im Bereich des Möglichen und sollten in dieser Arbeit geprüft werden.

3. Indikatoren für eine Leberschädigung

Als Indikatoren für eine experimentell erzeugte Leberschädigung wurden verschiedene Enzym- und Fettstoffwechselparameter der Leber hinsichtlich charakteristischer Veränderungen ausgewertet. Während eine Veränderung des relativen Lebergewichts und des Wassergehalts der Leber einen grob orientierenden Überblick über die Ursache einer eventuellen

Änderung des Lebergewichts der Versuchstiere erlaubt, gibt die Bestimmung der Transaminasen Glutamat-Pyruvat-Transaminase und Glutamat-Oxalat-Transaminase Aufschluß über die Mechanismen einer Leberschädigung. Beide Enzyme liegen physiologischerweise in nur geringer Konzentration im Plasma vor. Für das relativ große Organ Leber gilt, daß bereits schon leichte Schädigungen wie z.B. eine Erhöhung der Membranpermeabilität der Hepatozyten zu einem diagnostisch verwertbaren Enzymanstieg führen können. Dabei ist die GPT etwas leberspezifischer als die GOT, da erstere vorwiegend in Leberzellen, letztere aber auch in Herzmuskel- und Muskelzellen in größeren Mengen vorkommt. Andererseits stellt eine starke Erhöhung der GOT-Aktivität einen Hinweis auf eine Leberzellnekrose dar, da dieses Enzym nicht nur im Zytoplasma gelöst, sondern als mGOT zu einem Teil in den Mitochondrien gebunden vorliegt (52).

Harnstoff ist das wichtigste stickstoffhaltige Endprodukt des Eiweißstoffwechsels. Die Höhe des Harnstoffgehalts des Serum hängt von der Funktion der Leber und der Nieren ab. Bei intakter Funktion dieser Organe weist ein Ansteigen auf Proteinkatabolismus hin, ein Abfallen läßt anabole Vorgänge vermuten.

Die Alkalische Phosphatase im Serum dient bei entsprechender klinischer Symptomatik als Indikator für eine Cholestase, wobei diese primär durch eine toxische Schädigung der gallesezernierenden Organellen der Leber als auch sekundär durch verhinderten Galleabfluß bedingt sein kann (45, 46). Auch unspezifische Leberschädigungen können zu einem vermehrten Einstrom von Alkalischer Phosphatase ins Blut führen.

Cholesterin als ein ubiquitärer steroidaler Bestandteil des tierischen und menschlichen Organismus ist ein wichtiger Teil von Zell- und Gewebsstrukturen, Ausgangspunkt für die Biosynthese von Steroidhormonen und Gallensäuren und nimmt in den Lipoproteinen teil am Fetttransport im Organismus (6,51). Die Ausscheidung erfolgt über die Galle, wobei deren Ausmaß der Beeinflussung durch Zusammensetzung und Menge des Nahrungsfettes, verschiedener Hormone und bestimmter Medikamente unterliegt (66).

Die Leber hat außerdem die Funktion der Regulation des Serum-Triglyzeridspiegels. Der Fettgehalt des Organs ist dabei das Resultat mehrerer, normalerweise im Gleichgewicht stehender lipogener und lipotroper Faktoren (27). Eine Zunahme des Lebertriglyzeridgehalts kann demnach nicht nur bei toxischer Zellschädigung, sondern auch infolge einer Störung dieses komplizierten Regulationsgefüges auftreten (12).

B. Methodik

1. Versuchstiere

Unter Berücksichtigung der jahreszeitlichen Änderung der Stoffwechsellage der Versuchstiere wurden die Versuche in der Zeit von Mai bis September 1980 durchgeführt. Es fanden geschlechtsreife weibliche NMRI-Mäuse mit 25 ± 3 Gramm Körpergewicht Verwendung. Diese wurden nach Versuchsgruppen geordnet bei konstanter Raumtemperatur von 25°C in Plastikkästen auf Weichholzgranulat gehalten. Es bestand ein gleichbleibender Hell-Dunkel-Rhythmus von jeweils 12 Stunden Dauer. Als Nahrung diente Standardpreßfutter (Herilan) und Wasser ad libitum. Um die circadiane Periodik des Mäusestoffwechsels als Störfaktor auszuschalten, wurde jede Versuchsreihe in der Zeit von 7 bis 8 Uhr MEZ gestartet. Alle Tiere wurden ausnahmslos den gleichen Bedingungen unterworfen.

2. Verwendete Testsubstanzen

Ethinylestradiol wurde uns als Reinsubstanz freundlicherweise von der Fa. Schering, Berlin, zur Verfügung gestellt. Als Vehikel zur subkutanen Injektion diente Olivenöl gemäß DAB 7. Doxycyclin erhielten wir ebenfalls in Reinform von der Fa. Pfizer, Karlsruhe. Zur intravenösen Applikation wurde es in 1,5 mM Magnesiumsulfatlösung gelöst. Entsprechend der vorgesehenen Dosierung wurden die Lösungen exakt eingewogen und sofort aufgebraucht. Die applizierten Volumina betrugen pro Injektion 10 $\mu\text{l/g}$ Körpergewicht.

3. Vorversuch

Vorversuche mit steigenden Oestrogendosen dienten dazu, eine submaximal toxische Ethinylestradioldosis zu ermitteln. Als Anhaltspunkte bedienten wir uns der Studie von KREEK (31), der bei Ratten, die über wenige Tage

mit 2 ug Ethinylestradiol/g Körpergewicht behandelt wurden, eine Cholestase feststellte, und der Untersuchungen von GÖTZ (20), in denen eine Dosis von 1 ug Ethinylestradiol/g Körpergewicht zu einer Leberaffektion bei Mäusen führte. Schließlich fanden drei Dosierungen in den Vorversuchen Anwendung: 0,5 ug, 1,0 ug und 5,0 ug Ethinylestradiol/g Körpergewicht. Eine Kontrollgruppe erhielt nur Olivenöl. Den Tieren wurde vier Tage lang je eine Einzeldosis subkutan injiziert, 24 Stunden nach der letzten Injektion wurde die Versuchsreihe beendet und zur Bestimmung der Hepatotoxizität die Änderungen des relativen Lebergewichts, des Blutspiegels der Glutamat-Pyruvat-Transaminase, der Glutamat-Oxalat-Transaminase und der Alkalischen Phosphatase sowie des Serum-Harnstoffspiegels herangezogen. Aufgrund der auf S. 16 beschriebenen Ergebnisse wurde für die Hauptversuche die Dosis von 0,5 ug Ethinylestradiol/g Körpergewicht, die bereits geringe hepatotoxische Eigeneffekte zeigte, ausgewählt.

4. Hauptversuch

4.1. Durchführung

Für den Hauptversuch wurden vier Behandlungsgruppen gebildet. Die Tiere der Kontrollgruppe K erhielten nur Vehikellösung, d.h. vier Tage je eine subkutane Injektion Olivenöl und 24 Stunden nach der letzten Behandlung eine Einzeldosis Magnesiumsulfatlösung intravenös. In der Gruppe DC wurde den Mäusen zunächst ebenfalls nur Olivenöl injiziert, wir applizierten am fünften Tag jedoch eine Dosis von 50 ug Doxycyclin/g Körpergewicht intravenös. Mit den Tieren der Gruppe EE führten wir über vier Tage eine Behandlung mit 0,5 ug Ethinylestradiol/g Körpergewicht durch. Diesen Versuchstieren wurde 24 Stunden nach der letzten Applikation Magnesiumsulfatlösung intravenös gespritzt. Die Mäuse der Gruppe DC + EE schließlich erhielten nach einer Behandlung mit 0,5 ug Ethinylestradiol/g Körpergewicht, über vier Tage verabreicht, am fünften Tag 50 ug Doxycyclin/g Körpergewicht intravenös appliziert. Um den zeitlichen Ablauf der erzeugten Leberschädigung verfolgen zu können, wurden fünf Versuchsreihen gestartet mit einer Doxycyclin-Einwirkungs-

dauer von 2, 4, 8, 24 respektive 48 Stunden. Den Behandlungsplan zeigt Tabelle 1, S. 12.

4.2. Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Die zuvor gewogenen Mäuse wurden durch Dekapitation getötet und entblutet. Das aufgezogene Blut wurde sofort ohne Zusatz von Gerinnungshemmern bei 3 - 4000 U/min für 15 - 20 Minuten zentrifugiert. Zur Vermeidung späterer Hämolyse wurde das überstehende Serum abpipetiert und am gleichen Tag weiterverarbeitet. Bereits hämolytisches Serum konnte, um falsch positive Ergebnisse auszuschließen, i.d.R. nicht für die Bestimmungen herangezogen werden.

Den Tieren wurde unmittelbar nach der Tötung die Leber sorgfältig herauspräpariert und auf einer elektronischen Waage ihr Frischgewicht bestimmt. Ein Stück der Leber wurde mit neun Teilen physiologischer NaCl-Lösung versetzt und im Ultra-Turrax homogenisiert. Anschließend wurden 1 ml des Homogenats zur Ermittlung des Trockengewichts eingeengt und das Ergebnis um den Anteil an zugesetztem NaCl korrigiert.

4.3. Testprinzipien der durchgeführten klinisch-chemischen Bestimmungen

- Relatives Lebergewicht

Das relative Lebergewicht errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{relatives Lebergewicht} = \frac{\text{Lebergewicht}}{\text{Körpergewicht}}$$

- Wassergehalt der Leber

Der Wassergehalt der Leber wurde aus der Differenz zwischen Frisch- und Trockengewicht des Organs berechnet und in Prozent vom Frischgewicht ausgedrückt.

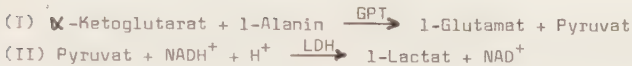
- Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)

Die Bestimmung der GPT erfolgte gemäß der Optimierten Standardmethode der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (43) mithilfe der

Tab. 1: Behandlungsplan der Tiere im Hauptversuch. Bestimmung von Parametern der Leberfunktion: 2, 4, 8, 24 bzw. 48 Stunden nach der Behandlung am 5. Tag.
 K = Kontrollgruppe, DC = Doxycyclin, EE = Ethinylestradiol
 KG = Körpergewicht

Gruppe	K	DC	EE	DC + EE
1	K	ⁿ DC	ⁿ EE	ⁿ DC + EE
2. Tag	10 µl Öl/g KG sc	10 µl Öl/g KG sc	0,5 µg/10 µl/g KG sc	0,5 µg/10 µl/g KG sc
2. Tag	-"	-"	-"	-"
3. Tag	-"	-"	-"	-"
4. Tag	-"	-"	-"	-"
5. Tag	10 µl 1,5mM MgSO ₄ /g KG iv	50 µg DC in 10 µl 1,5 mM MgSO ₄ /g KG iv	10 µl 1,5mM MgSO ₄ /g KG iv	50 µg DC in 10 µl 1,5 mM MgSO ₄ /g KG iv

Test-Combination Nr. 124575 der Fa. Boehringer Mannheim. Testprinzip:



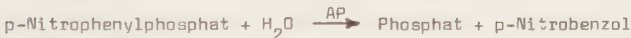
- Glutamat-Oxalat-Transaminase (GOT)

Die GOT wurde ebenfalls gemäß der Optimierten Standardmethode (42) mit der Test-Combination Nr. 124427 von Boehringer Mannheim nach den vom Hersteller angegebenen Vorschriften bestimmt. Der Methode liegt folgendes Testprinzip zugrunde:



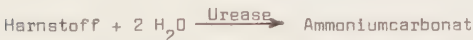
- Alkalische Phosphatase (AP)

Auch zur Bestimmung der Alkalischen Phosphatase wurde die Optimierte Standardmethode (43) angewandt. Wir arbeiteten mit der Test-Combination Nr. 123854 der Fa. Boehringer Mannheim. Testprinzip war folgendes:



- Serum-Harnstoff

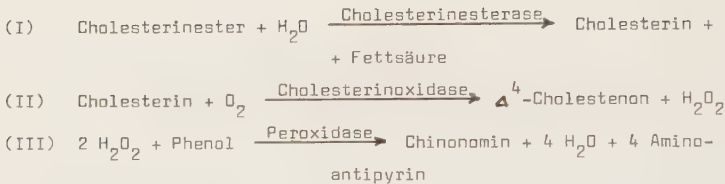
Die Bestimmung des Serum-Harnstoffspiegels erfolgte als enzymatischer Farbttest unter Anwendung der Test-Combination Nr. 124788 der Fa. Boehringer Mannheim. Testprinzip war die als Berthelot-Reaktion bekannte Spaltung mit Urease:



Ammoniumcarbonat reagiert mit Phenol und Hypochlorit unter Bildung eines Farbkomplexes.

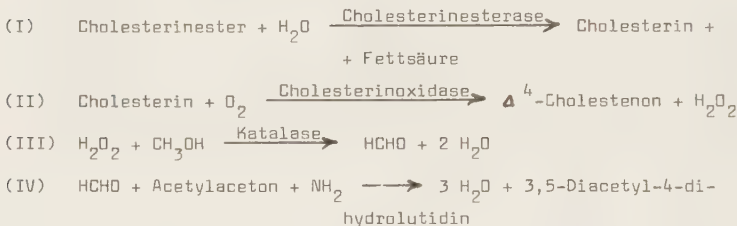
- Serum-Cholesterin

Die Bestimmung des Gesamt-Cholesterins im Serum erfolgte als enzymatischer Farbttest mithilfe des Ingotest^R 574851 der Fa. Boehringer Ingelheim Diagnostika. Testprinzip:



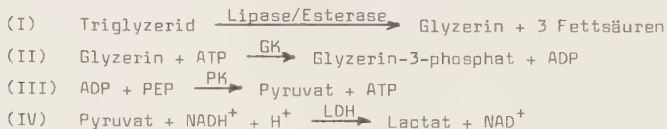
- Lebercholesteringehalt

Zur Bestimmung des Cholesteringehalts der Leber wurde der enzymatische Farbttest der Fa. Boehringer Mannheim (Nr. 124087) vorschriftsmäßig durchgeführt. Die Proben- und Leerwertansätze mit Homogenat wurden zur Entfernung der Schwebstoffe vor der Messung zentrifugiert. Die Methode beruht auf folgendem Testprinzip (48):



- Serum-Triglyzeride und Lebertriglyzeridgehalt

Die Bestimmung des Neutralfettes in Serum und Leber erfolgte vollenzymatisch mit Hilfe der Test-Combination Nr. 126039 der Fa. Boehringer Mannheim nach den vom Hersteller angegebenen Vorschriften. Proben- und Leerwertansätze mit Homogenat wurden vor der Messung zentrifugiert. Der Methode liegt folgendes Testprinzip zugrunde (61):



4.4. Qualitätskontrolle

Die Qualitätskontrolle erfolgte mittels der Testseren Precinorm^R und Precilip^R von Fa. Boehringer Mannheim respektive mit Präz. dos (ingo-test^R 580731). Die dabei erzielten Werte lagen stets im zulässigen Bereich.

4.5. Statistische Auswertung

Aus den gemessenen Einzelwerten jeder Versuchsreihe und -gruppe wurden der Mittelwert $\bar{x}$ und dessen Streuung SEM berechnet. Signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe der Einfachen Varianzanalyse im paarweisen Vergleich ermittelt. Als signifikant galten Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5 % ($p \leq 0,05$). Die oberen Signifikanzschranken der F-Verteilung entnahmen wir einer einschlägigen Tabelle.

C. Ergebnisse

1. Vorversuch

Das relative Lebergewicht und die Serumspiegel von Alkalischer Phosphatase, GOT und GPT nahmen unter Ethinylestradiol zu. Bei den mit 0,5 ug Ethinylestradiol/g behandelten Mäusen trat bereits eine signifikante Erhöhung der Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe, die nur Olivenöl erhielt, ein. In der Gruppe mit 1,0 ug Ethinylestradiol/g fand sich eine weitere signifikante Zunahme. Hingegen erbrachte eine Dosis von 5,0 ug Ethinylestradiol/g keine zusätzliche Änderung mehr. Die Alkalische Phosphatase stieg allerdings auch nach 5,0 ug Ethinylestradiol/g noch weiter an (Abb. 1 - 4). Der Serum-Harnstoffspiegel zeigte zwar die Tendenz, unter Ethinylestradioleinfluß zu sinken, aber wegen der relativ großen Schwankung der Kontrollwerte und der kleinen Zahl der untersuchten Tiere (n jeweils 5) waren die Abweichungen nicht signifikant (Abb. 5).

Die dargelegten Resultate ließen für den Hauptversuch die Dosis von 0,5 ug Ethinylestradiol/g Körpergewicht über vier Tage verabreicht als am geeignetsten erscheinen.

2. Hauptversuch

2.1. Relatives Lebergewicht (Abb. 6)

Bei den nur mit Ethinylestradiol vorbehandelten Mäusen war das relative Lebergewicht zu allen Zeiten signifikant erhöht.

Doxycyclin allein verursachte keine signifikanten Veränderungen des relativen Lebergewichts.

Bei den mit Ethinylestradiol + Doxycyclin behandelten Tieren war das relative Lebergewicht etwa um den gleichen Betrag oder etwas weniger

stark erhöht als bei den nur mit Ethinylestradiol behandelten Tieren.

2.2. Wassergehalt der Leber (Abb. 7)

Es ergab sich eine deutlich signifikante Zunahme des Wassergehalts der Leber unter Ethinylestradioleinfluß, besonders in den ersten 8 Stunden des Hauptversuchs.

Doxycyclin führte allein und bei den mit Ethinylestradiol vorbehandelten Tieren zu keinen signifikanten Veränderungen gegenüber den Kontrollgruppen und hatte keinen signifikanten Einfluß auf den durch Ethinylestradiol erhöhten Wassergehalt der Leber.

2.3. Glutamat-Oxalat-Transaminase im Serum (Abb. 8)

Im Gegensatz zum Vorversuch, in dem Ethinylestradiol in der Dosis von 4mal 0,5 µg/g KG eine gerade signifikante Zunahme der Serum-GOT hervorgerufen hatte, war die GOT im Hauptversuch nur zu zwei Zeiten signifikant vermehrt.

Doxycyclin verursachte alleine gegeben erst nach 48 Stunden eine signifikante Zunahme der GOT-Aktivität.

Bei den mit Ethinylestradiol vorbehandelten Mäusen führte Doxycyclin bereits nach 2 und 4 Stunden zu einem starken Anstieg der Serum-GOT. Zu den späteren Zeiten (8 und 24 Stunden) waren die Veränderungen der Serum-GOT nach der kombinierten Behandlung etwas geringer als nach Ethinylestradiol allein. Nach 48 Stunden war die GOT-Aktivität bei den mit Ethinylestradiol + Doxycyclin behandelten Tieren im Bereich der Norm.

2.4. Glutamat-Pyruvat-Transaminase im Serum (Abb. 9)

Für die Serum-GPT lagen die Verhältnisse ähnlich wie für die Serum-GOT.

Ethinylestradiol führte zu geringen signifikanten bzw. noch nicht signifikanten Zunahmen.

Unter Doxycyclin allein erfolgte erst nach 48 Stunden ein signifikanter Anstieg der GPT-Aktivität im Serum.

Unter der kombinierten Behandlung stieg die Serum-GPT-Aktivität bereits ab der 2. Stunde an und war ab der 8. bis zur 48. Stunde etwa ebenso stark erhöht wie unter Ethinylestradiol bzw. Doxycyclin allein.

2.5. Alkalische Phosphatase im Serum (Abb. 10)

Ethinylestradiol bewirkte in allen Versuchsreihen eine erhebliche Zunahme der Alkalischen Phosphatase im Serum.

Doxycyclin allein führte demgegenüber zu einer nur geringen, z.T. signifikanten Erhöhung nach 4 bis 24 Stunden.

Bei den mit Ethinylestradiol vorbehandelten Tieren führte Doxycyclin zu keiner zusätzlichen Erhöhung der Alkalischen Phosphatase im Serum. Nach 24 Stunden kam es sogar zu einer Verringerung der Zunahme des Enzyms im Serum gegenüber der Kontrollgruppe, die nur mit Ethinylestradiol behandelt wurde.

2.6. Serum-Harnstoff (Abb. 11)

Ethinylestradiol verursachte - ähnlich wie auch im Vorversuch - im Hauptversuch nur geringe, in der Regel nicht signifikante Veränderungen des Serum-Harnstoffgehalts.

Doxycyclin führte allein verabreicht zu einer signifikanten Erhöhung der Serum-Harnstoffkonzentration von der 2. bis zur 8. Stunde.

Nach Ethinylestradiol-Vorbehandlung trat o.g. Anstieg nicht mehr auf.

2.7. Serum-Cholesterinspiegel (Abb. 12)

Bei alleiniger Ethinylestradiolbehandlung schwankte das Serum-Cholesterin ohne deutlich erkennbare Tendenz um die Kontrollwerte.

Die Gabe von Doxycyclin beeinflusste den Serum-Cholesterinspiegel nicht signifikant.

Zwischen den nur mit Ethinylestradiol behandelten Tieren und den Mäusen, die einer kombinierten Behandlung mit Ethinylestradiol + Doxycyclin unterworfen waren, bestanden hinsichtlich ihrer Serum-Cholesterinwerte keine signifikanten Unterschiede.

2.8. Cholesteringehalt der Leber (Abb. 13)

Ähnlich wie die Serum-Cholesterinspiegel schwankten die Cholesterinkonzentrationen der Leber um den Kontrollwert. Die Abweichungen nach Ethinylestradiolbehandlung waren zwar zum Teil signifikant, doch war eine eindeutige Tendenz nicht erkennbar.

Doxycyclin führte zu einer kurzfristigen signifikanten Senkung des Lebercholesteringehalts.

Bei den mit Doxycyclin + Ethinylestradiol behandelten Mäusen lag der Leber-Cholesterinspiegel nach 24 Stunden unter, nach 48 Stunden über den Werten, die bei den nur mit Hormon behandelten Tieren ermittelt wurden. Zu den anderen Zeiten lag er im gleichen Bereich wie bei den allein mit Ethinylestradiol behandelten Tieren.

2.9. Triglyzeridgehalt des Serums

Unter der Behandlung mit Ethinylestradiol und Doxycyclin einzeln und in Kombination kam es zu unregelmäßigen, i.d.R. nicht signifikanten Schwankungen des Serum-Triglyzeridspiegels um den Kontrollwert.

2.1a. Triglyzeridgehalt der Leber (Abb. 14 + 15)

Ethinylestradiol bewirkte zu allen Zeiten eine erhebliche Verminderung der Leber-Triglyzeride.

Doxycyclin allein verursachte keine signifikanten Veränderungen im Triglyzeridgehalt der Leber.

Bei den mit Ethinylestradiol vorbehandelten Tieren verringerte Doxycyclin die Abnahme der Triglyzeride im Vergleich zu den nur mit Ethinylestradiol behandelten Mäusen, doch lag der Triglyzeridgehalt der Leber auch unter diesen Bedingungen noch unterhalb der Kontrollwerte.

Bezieht man die Triglyzeridkonzentrationen auf das Trockengewicht der Leber anstatt auf das Frischgewicht, so ergeben sich ähnliche Verhältnisse (Abb. 15).

n= 10 15 15 15

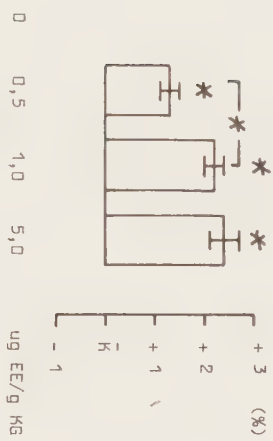


Abb. 1

Vorversuch

Abb. 1: Relatives Lebergewicht nach Behandlung mit Ethinylestradiol (EE) in aufsteigenden Dosen - Abweichung vom Kontrollwert K der unbehandelten Mäuse.

K = 5,82 %; * : signifikant gegen K mit $p \leq 0,05$; ** : signifikant im paarweisen Vergleich mit $p \leq 0,05$.

Abb. 2: Glutamat-Oxalat-Transaminase im Serum nach Behandlung mit Ethinylestradiol (EE) in aufsteigenden Dosen - Abweichung vom Kontrollwert K der unbehandelten Mäuse.

K = 104 U/l; * : signifikant gegen K mit $p \leq 0,05$; ** : signifikant im paarweisen Vergleich mit $p \leq 0,05$.

10 14 11 14

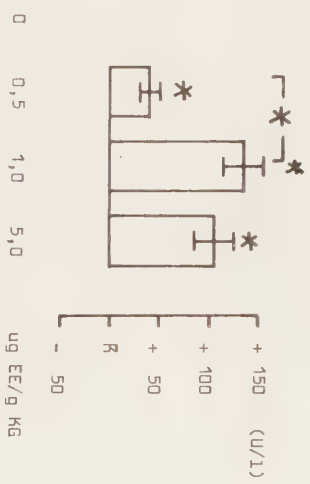


Abb. 2

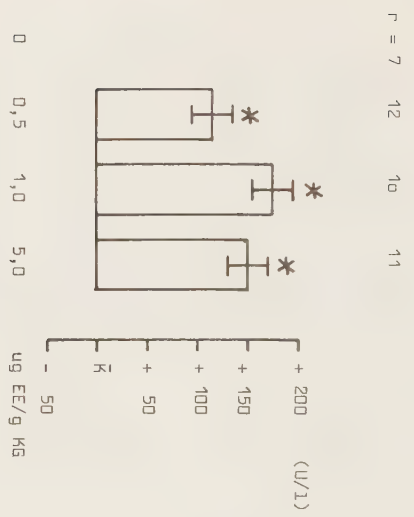


Abb. 3

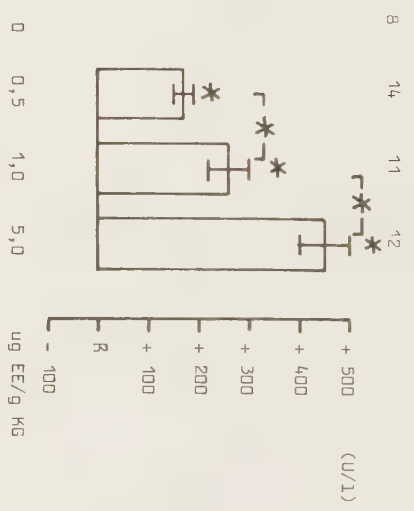


Abb. 4

Vorversuch

Abb. 3: Glutamat-Pyruvat-Transaminase im Serum nach Behandlung mit Ethinylestradiol (EE) in aufsteigenden Dosen - Abweichung vom Kontrollwert $\bar{K}$ der unbehandelten Mäuse.
 $\bar{K} = 30 \text{ U/l}$; * : signifikant gegen $\bar{K}$ mit $p \leq 0,05$; *- : signifikant im paarweisen Vergleich mit $p \leq 0,05$.

Abb. 4: Alkalische Phosphatase im Serum nach Behandlung mit Ethinylestradiol (EE) in aufsteigenden Dosen - Abweichung vom Kontrollwert $\bar{K}$ der unbehandelten Mäuse.
 $\bar{K} = 224 \text{ U/l}$; * : signifikant gegen $\bar{K}$ mit $p \leq 0,05$; *- : signifikant im paarweisen Vergleich mit $p \leq 0,05$.

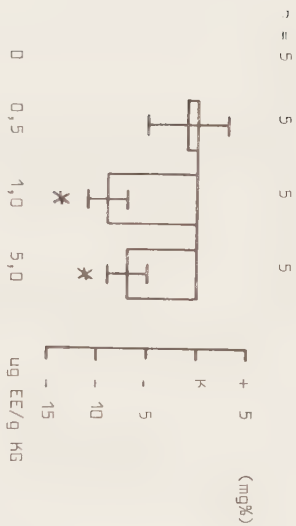


Abb. 5

Vorversuch

Abb. 5: Serum-Hormostoffspiegel nach Behandlung mit Ethinylstradiol (EE) in aufsteigenden Dosen - Abweichung vom Kontrollwert K der unbehandelten Mäuse.
 R = 36 mg%; * : signifikant gegen K mit $p \leq 0,05$; -*- : signifikant im paarweisen Vergleich mit $p \leq 0,05$.



Hauptversuch

Abb. 5: Relatives Übergewicht nach Behandlung mit Ethinylestradiol (EE) und Doxycyclin (DC) - Abweichung vom Kontrollwert $K \pm$ SEM, Behandlungsplan s. Tab. 1, S. 12. Mittlerer Kontrollwert $K = 5,67\%$; * : signifikant gegen K mit $p \leq 0,05$; ** - : signifikant im paarweisen Vergleich mit $p \leq 0,05$.

n = 10 10 10 9 10 10 10 10 9 9 10 10 10 10 10 10 10

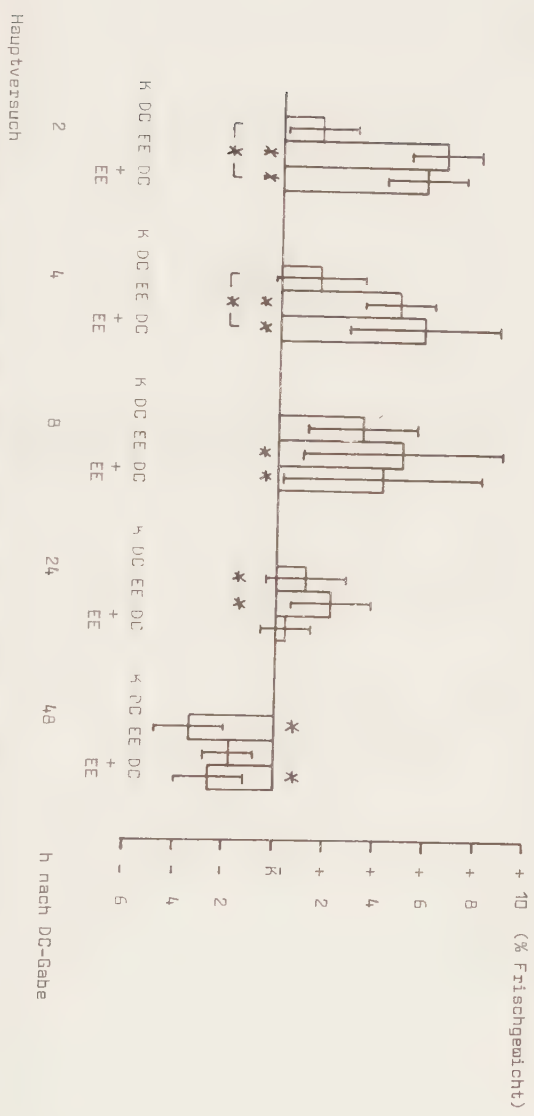


Abb. 7: Wasser- und Fettgehalt der Leber nach 3-Handlung mit Ethinyl-östradiol (EE) und Doxycyclin (DC) - Abweichung vom Kontrollwert K $\pm$ SEM. Behandlungssplan s. Tab. 1, S. 12. Mittlerer Kontrollwert K = 71,5 % des Frischgewichtes. * : signifikant gegen K mit $p \leq 0,05$; - * - : signifikant im paarweisen Vergleich mit $p \leq 0,05$.

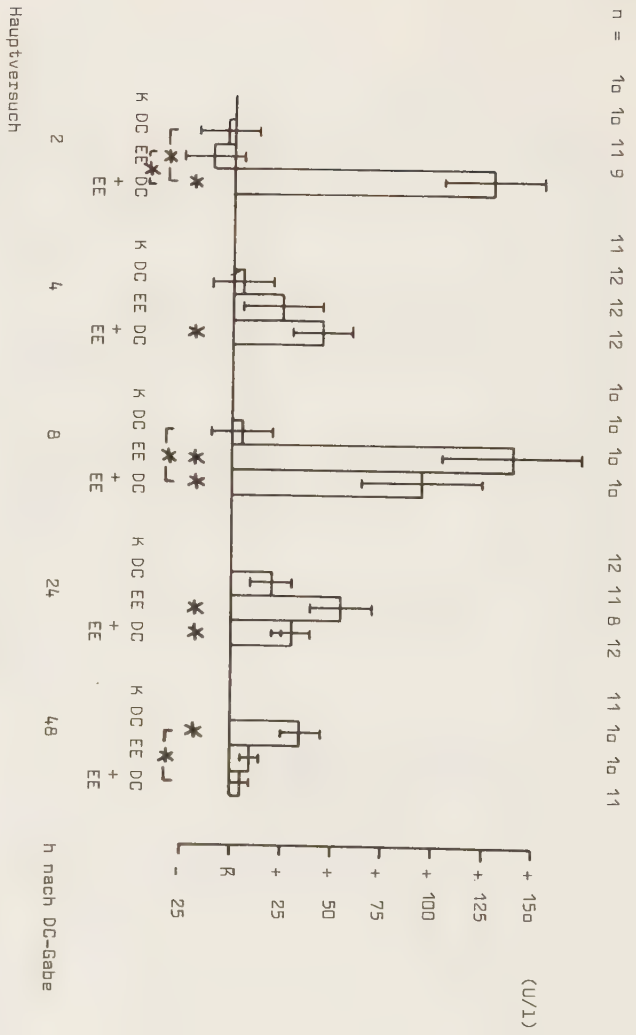


Abb. 8: Glutamat-Oxalat-Transaminase im Serum nach Behandlung mit Ethinyltestradol (EE) und Doxycyclin (DC) - Abweichung vom Kontrollwert $K \pm$ SEM. Behandlungssplan s. Tab 1, S. 12. Mittlerer Kontrollwert $K = 141$ U/l; * : signifikant gegen K mit $p \leq 0,05$; ** : signifikant im paarweisen Vergleich mit $p \leq 0,05$.

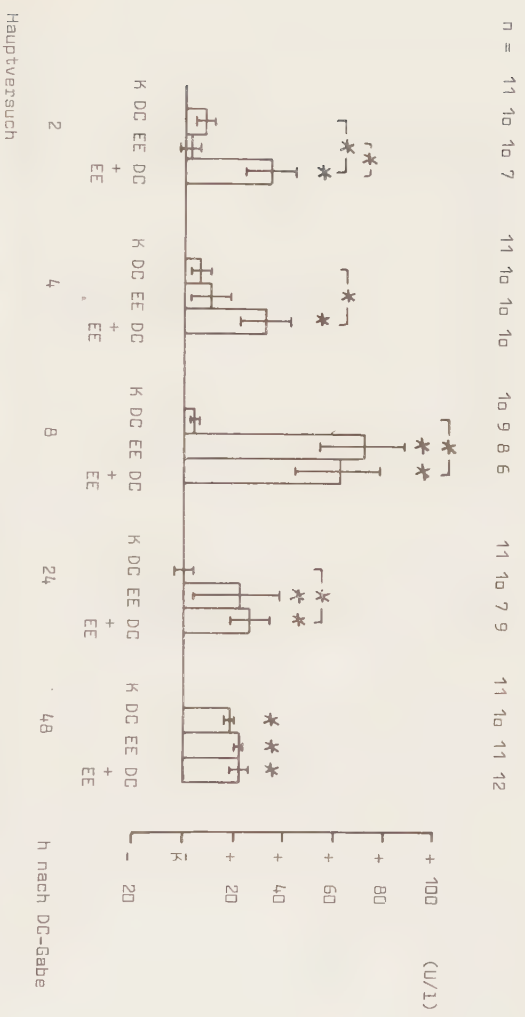


Abb. 3: Glutamat-Dehydrogenase im Serum nach Behandlung mit Ethinylestradiol (EE) und Doxycyclin (DC) Abweichung vom Kontrollwert K $\pm$ SEM, Behandlungsplan s. Tab. 1, S. 12. Mittlerer Kontrollwert K = 47 U/l; * : signifikant gegen K mit $p \leq 0,05$; ** : signifikant im paarweisen Vergleich mit $p \leq 0,05$.



Hauptversuch

Abb. 10: Alkalische Phosphatase im Serum nach Behandlung mit Ethinylestradiol (EE) und Doxycyclin (DC) - Abweichung vom Kontrollwert $\bar{x} \pm \text{SEM}$, Behandlungsplan s. Tab 1, S. 12. Mittlerer Kontrollwert $\bar{x} = 171 \text{ U/l}$; * : signifikant gegen K mit $p \leq 0,05$; *- : signifikant im paarweisen Vergleich mit $p \leq 0,05$.

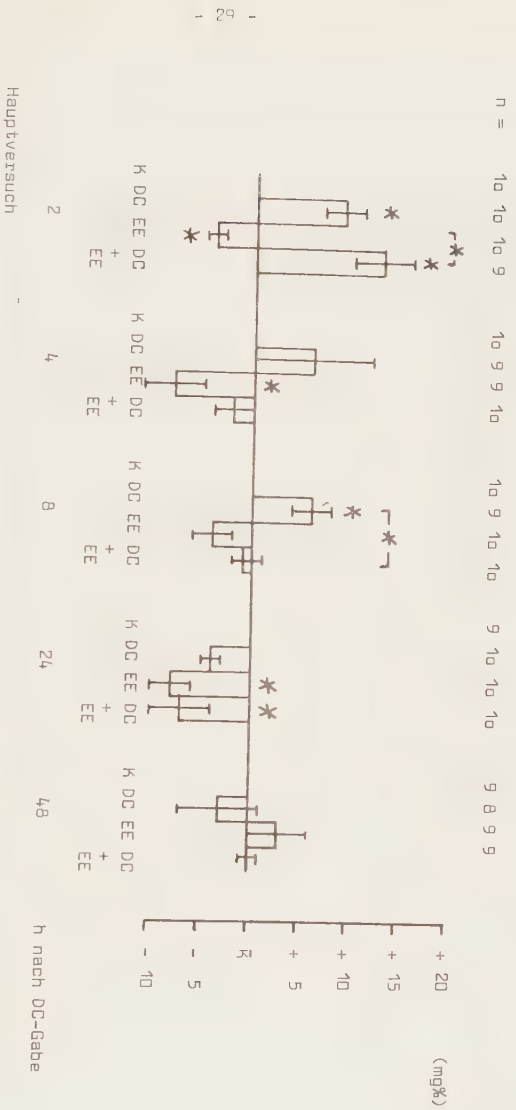


Abb. 71: Serum-Harnstoffspiegel nach Behandlung mit Ethinylöstradiol (EE) und Doxycyclin (DC) - Abweichung vom Kontrollwert $\bar{x} \pm \text{SEM}$. Behandlungsplan s. Tab. 1, S. 12.
 Mittlerer Kontrollwert $\bar{x} = 38 \text{ mg\%}$; * : signifikant gegen $\bar{x}$ mit $p \leq 0,05$; *- : signifikant im paarweisen Vergleich mit $p \leq 0,05$.

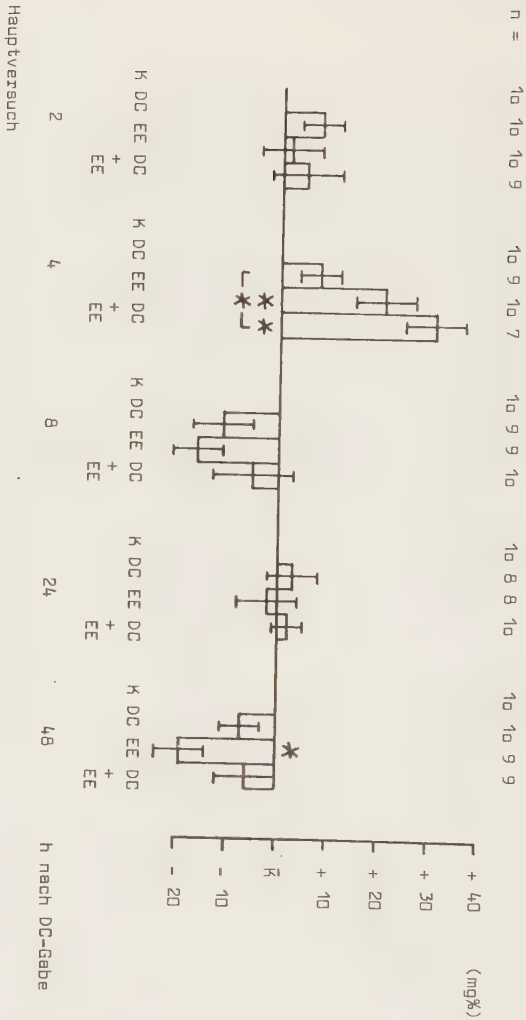


Abb. 12: Serum-Cholesterinspiegel nach Behandlung mit Ethinylestradiol (EE) und Doxycyclin (DC) - Abweichung vom Kontrollwert $\bar{K} \pm$ SEM. Behandlungsplan s. Tab. 1, S. 12. Mittlerer Kontrollwert $\bar{K} = 101 \text{ mg\%}$; * : signifikant gegen $\bar{K}$ mit $p \leq 0,05$; -*: signifikant im paarweisen Vergleich mit $p \leq 0,05$.

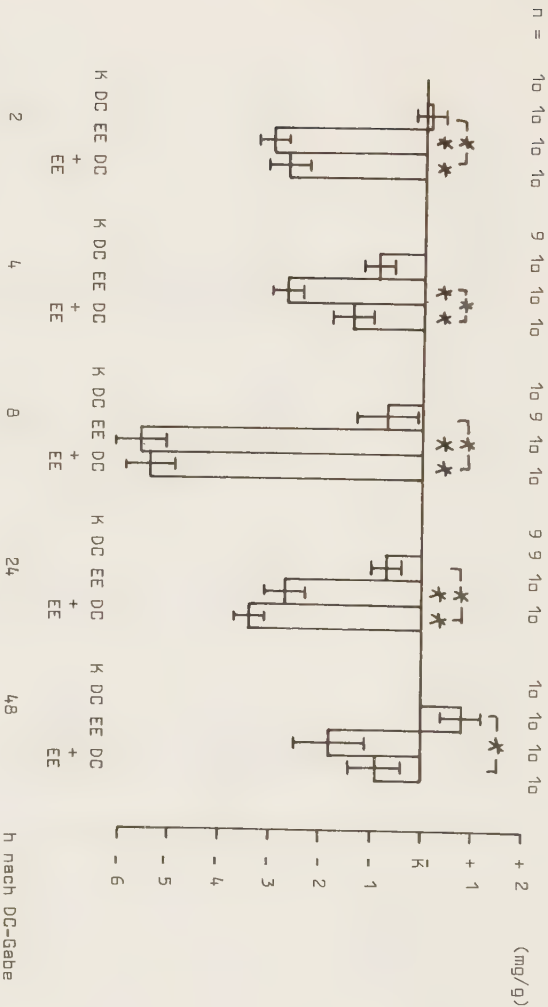
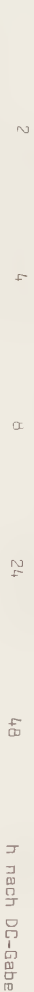


Abb. 14: Leber-Triglyzeridgehalt nach Behandlung mit Ethinylestradiol (EE) und Doxycyclin (DC) - Abweichung vom Kontrollwert $\bar{x} \pm$ SEM, Behandlungsplan s. Tab. 1, S. 12.
Mittlerer Kontrollwert $\bar{x} = 22,46$ mg/g; * : signifikant gegen K mit $p \leq 0,05$; ** : signifikant im paarweisen Vergleich mit $p \leq 0,05$.



Hauptversuch

Abb. 15: Lebererig-zyridigehalt nach Behandlung mit Ethinyltestradial (EE) und Doxycyclin (DC), berechnet aus der Trockenmasse der Leber. Abweichung vom Kontrollwert K, Behandlungsplan s. Tab. 1, S. 12. Mittlerer Kontrollwert $K = 6,63 \text{ mg/g}$.

D. Diskussion

1. Ethinylestradiol

Die Behandlung mit Ethinylestradiol führte in allen Versuchsreihen zu einer signifikanten Erhöhung des relativen Lebergewichts. Als Ursache dafür kommt in erster Linie der "Natrium retinierende Effekt" der Oestrogene in Betracht, wie ihn THORN und HARROP (56) erstmals 1937 beschrieben haben. Infolge einer Zunahme der Zytoplasmamembranpermeabilität kommt es dabei durch intrazelluläre Wassereinlagerung zu einer hydropischen Schwellung der Hepatozyten, was auch den Aktivitätsanstieg der Transaminasen GOT und GPT im Serum unserer Versuchstiere unter Ethinylestradiolbehandlung erklärt.

Die damit verbundene Erhöhung des Wassergehalts der Lebern wurde 72 Stunden nach der letzten Oestrogenbehandlung durch ein geringfügiges Absinken der entsprechenden Werte unter den Kontrollwert der unbehandelten Tiere abgelöst, wobei das relative Lebergewicht erhöht blieb. Dies läßt anabole Vorgänge bei der Zunahme des relativen Lebergewichts vermuten. In der Tat bewirkte die Oestrogenapplikation in unseren Versuchen eine deutliche Abnahme der Serum-Harnstoffkonzentration. Gleichzeitig nahm nach BÜCKER (persönliche Mitteilung) die Menge an DNA, RNA und Gesamtprotein pro Leber leicht zu.

Oestrogene verursachen eine Senkung der LDL und eine Zunahme der HDL und fördern selektiv die Metabolisierung bestimmter Aminosäuren. Zu ihren anabolen Wirkungen gehört auch eine Steigerung der Triglyzeridsynthese (34). So fand FURMAN (17) im Tierversuch nach Oestrogenzufuhr eine erheblich signifikante Erhöhung der Serum-Triglyzeride bei gleichzeitig mäßigem Abfall der Lebertriglyzeridkonzentrationen, was für eine vermehrte Ausschwemmung von Triglyzeriden aus der Leber spricht. NIKKILÄ und KEKKI (40) haben für Ovulationshemmer die Entstehung einer Hyperlipoproteinämie Typ IV durch die Vermehrung der prä- β -Lipoproteine (VLDL) beschrieben. In den von uns durchgeführten Versuchen zeigte sich ebenfalls eine signifikante Abnahme des Lebertriglyzerid-

gehalts, und zwar sowohl bezogen auf das Frischgewicht der Leber als auch auf die Lebertrockenmasse. Die Berechnung der absoluten Menge Fett pro Leber zeigte, daß eine Behandlung mit Ethinylestradiol zu einer deutlichen Abnahme der Triglyzeridkonzentrationen in den Lebern führte. Dieser Effekt ließ sich bis 48 Stunden nach der letzten Gabe von Ethinylestradiol nachweisen. Es kam jedoch nicht zu einem Ansteigen des Serum-Triglyzeridspiegels. Die Serum-Triglyzeridspiegel müssen allerdings mit Vorsicht bewertet werden, da ihre Höhe durch die spontane Nahrungsaufnahme nicht unerheblich beeinflußt wird. Unsere Resultate lassen also an eine verminderte Synthese von Triglyzeriden denken.

Die von BÜCKER (persönliche Mitteilung) beobachtete deutliche Zunahme von freiem Cholesterin bei unveränderter Konzentration an Gesamtcholesterin bei unseren Mäusen 26 und 28 Stunden nach der letzten Behandlung mit Ethinylestradiol könnte auf eine Störung der Cholesterinveresterung hinweisen. Die bei Oestrogenbelastung zunehmende exkretorische Insuffizienz der Leber, die nach JAVITT (24) über eine Hemmung der Galle-salzausscheidung auf dem Niveau der Hepatozyten und die Verminderung des Galleflusses bis zur Cholostase führen kann, ließen ein Ansteigen von Serum- und Lebercholesterinkonzentrationen erwarten. Bei der von uns verabreichten Dosis von 0,5 µg Ethinylestradiol/g Körpergewicht blieb dieser Anstieg aus. Die Cholesterinkonzentrationen in Serum und Leber schwankten sehr, wobei sicher die o.g. Beeinflussung durch die spontane Nahrungsaufnahme eine wesentliche Rolle spielt. Lediglich die zu allen untersuchten Zeiten stark erhöhte Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Serum, welche ein Indikatorenzym für die Cholostase darstellt, könnte auf eine exkretorische Störung der Leber mit erhöhter Zell- und Gallengangpermeabilität hinweisen.

2. Doxycyclin

Doxycyclin hatte in der verwendeten Dosis keinen meßbaren Einfluß auf das relative Lebergewicht und den Wassergehalt der Leber. Auch die Veränderungen der anderen untersuchten Parameter waren gering und entsprachen früheren Befunden (2). Eine Ausnahme bildete die passagere Zunahme des Serum-Harnstoffspiegels, eine für die proteinkatabole Wir-

kung des Doxycyclins charakteristische Veränderung (11,38,55). Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch BÖCKER u.Mitarb. (3) bei früheren Versuchen mit weiblichen und männlichen Mäusen.

Als Ergebnis der Doxycyclinbehandlung läßt sich festhalten, daß eine Dosis von 50 ug Doxycyclin/g Körpergewicht offensichtlich noch nicht die für Tetracycline beschriebenen Leberschädigungen hervorruft. Die Reversibilität der festgestellten Veränderungen spricht eher für eine vorübergehende Änderung der Membranpermeabilität denn für Zelluntergang und Leberzellnekrosen, wie sie, nach WILDHIRT (65) bei Tetracyclindosen von 140 -200 ug /g Körpergewicht und Tag, vornehmlich aus den USA berichtet wurden. Dies stimmt überein mit klinischen Untersuchungen am Menschen. So stellten HANY u. Mitarb. (21) auch nach 15 bis 31tägiger Behandlung lebergesunder und -kranker Patienten mit Doxycyclin keine Veränderungen der Serumaktivitäten von GOT, GPT und Alkalischer Phosphatase fest.

Ein Vergleich mit den Arbeiten von SCHRAMM (53) und FEINER (16), die unter identischen Bedingungen Tetracyclin in Dosierungen von 50 und 100 ug/g Körpergewicht einsetzten, zeigt, daß unter Tetracyclin die Parameter des Leberstoffwechsels stärkere Veränderungen aufweisen als unter Doxycyclin. Insbesondere kommt es zu einem ausgeprägteren Anstieg der Transaminasen GOT und GPT im Serum.

In der Zusammenschau mit anderen Tetracyclinderivaten, die in unserem Institut auf ihre Hepatotoxizität hin untersucht wurden, zeigt sich für das Doxycyclin die geringste leberschädigende Wirkung (2,3,37). Eine ausführliche Darstellung und Diskussion der Tetracyclineffekte findet sich bei MAYWALD (37).

3. Kombinierte Behandlung mit Doxycyclin und Ethinylestradiol

Die von SPARANO et al. (57) postulierte Schutzwirkung der Oestrogene vor tetracyclininduzierten Leberschädigungen kann zumindest für die von uns gewählten Dosen von 0,5 ug Ethinylestradiol/g und 50 ug Doxycyclin/g anhand der untersuchten Stoffwechselfparameter nicht bestätigt

werden. In den Versuchen beobachteten wir synergistische und antagonistische Effekte einer kombinierten Behandlung gleichermaßen. Das starke Ansteigen der Serum-Aktivitäten von GOT und GPT bei den mit Oestrogen vorbehandelten Mäusen zwei und vier Stunden nach der Applikation von Doxycyclin weist auf eine kurzfristige Addition der toxischen Effekte hin. Als Antagonismus sind vor allem die Auswirkungen auf den Serum-Harnstoffspiegel zu bezeichnen. Während zwei Stunden nach der Gabe von Doxycyclin die anabole Wirkung des Ethinylestradiol unterdrückt wurde, stellten wir zu den anderen Zeiten ein Ausbleiben des als Anzeichen eines Proteinkatabolismus zu wertenden durch Doxycyclin verursachten Anstiegs des Serum-Harnstoffspiegels fest. Unsere Beobachtungen stimmen im Wesentlichen mit den von SCHRAMM (53) und FEINER (16) getroffenen überein.

In Übereinstimmung mit GÖTZ (20), der bei mit Rolitetraacyclin behandelten Mäusen unter Ethinylestradiol-Gabe additive und antagonistische Effekte in Abhängigkeit von der Dosierung der beiden Substanzen fand, läßt sich festhalten, daß bei dem komplizierten Interaktionsgeschehen von Oestrogenen und Tetraacyclinen der Dosierung beider Pharmaka eine entscheidende Rolle für die Entstehung von Leberschäden zukommt. Trotz verschiedener Berichte über fatale Ausgänge einer kombinierten Behandlung mit Oestrogenen und Tetraacyclinen sehen wir angesichts der o.a. Resultate unserer Versuche keinen Hinweis auf eine gefährliche Interaktion zwischen Doxycyclin und Ethinylestradiol.

E. Zusammenfassung

Verschiedene Berichte über tödliche Ausgänge einer hochdosierten Tetracyclintherapie insbesondere bei schwangeren Frauen und tierexperimentelle Forschungen, die für Tetracycline eine Geschlechtsabhängigkeit bei den Nebenwirkungen auf die Leber aufzeigten, lassen auf ein kompliziertes Interaktionsgeschehen zwischen Oestrogenen und Tetracyclinen i.S. einer gegenseitigen Wirkungsverstärkung schließen, was u.U. eine Kontraindikation für die gleichzeitige Anwendung beider Stoffgruppen darstellen könnte. Dies veranlaßte uns, den Einfluß eines Tetracyclin-derivats, des Doxycyclins, bei gleichzeitiger Gabe von Ethinylestradiol auf ausgewählte Stoffwechselfparameter der Leber gerade geschlechtsreifer weiblicher NMRI-Mäuse zu untersuchen.

Weibliche Mäuse, die mit 0,5 µg Ethinylestradiol/g Körpergewicht über vier Tage vorbehandelt worden waren, erhielten am fünften Tag eine Einzeldosis von 50 µg Doxycyclin/g Körpergewicht intravenös appliziert. Drei Kontrollgruppen, die nur Vehikellösung, Doxycyclin oder Ethinylestradiol erhielten, wurden den gleichen Bedingungen unterworfen. 2, 4, 8, 24 respektive 48 Stunden nach der Doxycyclingabe wurden die Mäuse durch Dekapitation getötet und relatives Lebergewicht, Wassergehalt der Leber, Transaminasen GOT und GPT im Serum, Alkalische Phosphatase im Serum, Serum-Harnstoffspiegel sowie die Serum- und Leberkonzentrationen von Cholesterin und Triglyzeriden bestimmt.

Folgende Resultate wurden erzielt:

1. Ethinylestradiol

- Die Behandlung mit 0,5 µg Ethinylestradiol/g Körpergewicht über 4 Tage führt zu einer vorübergehenden Permeabilitätsänderung der Zellmembran der Hepatozyten mit Wassereinlagerung und Austritt von Enzymen wie S-GOT und S-GPT.
- Ein Anstieg der Alkalischen Phosphatase weist auf eine beginnende exkretorische Insuffizienz der Leber hin.
- Es kommt zu einem Absinken der Lebertriglyzeridkonzentration und der absoluten Menge Neutralfett pro Leber bei fehlender Erhöhung des

Serumtriglyzeridspiegels, was in Verbindung mit der erkennbaren Zunahme des Gesamtproteingehalts und dem Rückgang des Serum-Harnstoffspiegels auf proteinanabole Vorgänge schließen läßt.

2. Doxycyclin

- Die verwendete Doxycyclindosis von 50 µg/g Körpergewicht konnte bei einmaliger Applikation die verschiedentlich beschriebenen irreversiblen leberschädigenden Effekte anderer Tetracycline nicht hervorrufen.
- Ein Vergleich mit anderen Tetracyclinderivaten läßt dem Doxycyclin die geringste hepatotoxische Wirkung zukommen.
- Der beobachtete Anstieg des Serum-Harnstoffspiegels 2 und 8 Stunden nach der Applikation ist das Resultat der bekannten proteinkatabolen Wirkung der Tetracycline.

3. Kombination Ethinylestradiol + Doxycyclin

- Bei der kombinierten Behandlung mit Ethinylestradiol und Doxycyclin konnten wir einen additiven Effekt lediglich 2, andeutungsweise auch 4 Stunden nach der Gabe des Antibiotikums in der Erhöhung der Serum-Aktivitäten der Transaminasen GOT und GPT erkennen.
- Bezüglich der anabolen und katabolen Stoffwechselwirkungen beider Substanzen kam es (sichtbar an den Änderungen des Serum-Harnstoffspiegels) eher zu einem Antagonismus.

- (7) CHAO, Y.,
WINDLER, E. E.,
CHEN, G. C.,
HAVEL, R. J.
Hepatic Catabolism of Rat and Human
Lipoproteins in Rats Treated with
17 α -Ethinyl-Estradiol
The Journal of Biological Chemistry
Vol. 254, No. 22:11360-66(1979)
- (8) COLE, F. M.,
SWEENEY, G. D.
Changes in Rat Hepatocytic Plasma
Membranes Caused by Synthetic Estro-
gens
Lab. Invest. Vol. 42, No. 2:225-30
(1980)
- (9) CRAVEN, G. R.,
GAVIN, R.,
FAMMING, T.
The Transfer RNA-bindingsite of the
30S Ribosome and the site of Tetracyc-
line Inhibition
Sympos. Quant. Biol. 34:129-37(1969)
- (10) DASCHNER, F.
Infektionskontrolle in Klinik und
Praxis
2. Aufl., Verlag G. Witzstrock,
Baden-Baden (1980)
- (11) DAVIS, J. S.,
KAUFMAN, R. H.
Tetracycline toxicity
Am. J. Obst. 95:523-29(1965)
- (12) DOERR, W.
Organpathologie
Bd. II, 1. Aufl., S. 4-157f.,
Thieme Verlag, Stuttgart (1974)
- (13) FABRE, J.,
MILEK, E.,
KALFOPOULOS, P.
La cinétique des tétracyclines chez
l'homme II - Excrétion, pénétra-
tion dans les tissus normaux et in-
flammatoires en cas d'insuffisance
rénale et d'hémodialyse
Schweiz. Med. Wschr. 101:625-33(1971)

- (14) FABRE, J.,
KUNZ, J.P.,
VIRIEUX, C.,
LAURENCET, J.L.,
PITTON, J.S. Le compartement de la Doxycycline
chez l'homme
Chemotherapy Suppl. 13:23-40(1968)
- (15) FAWCETT, J.K.,
SCOTT, J.E. A rapid and precise method for the
determination of urea
J.clin.Path. 13:156-9(1960)
- (16) FEINER, C. o.T.
unveröffentlichte Studie aus dem
Institut für Pharmakologie und Toxi-
kologie der Universität Erlangen -
Nürnberg
- (17) FURMAN, R.H. Are gonadal hormones (estrogenes and
androgenes) of significance in the
development of ischemic heart disease?
Ann.NY.Acad.Sci. 149:823-33(1968)
- (18) GALLAGHER, T.F. jr.,
MÜLLER, M.N.,
KAPPAS, A. Estrogen Pharmacology IV
Studies on the structural basis for
estrogen-induced impairment of liver
function
Medicine(Baltimore) 45:471-79(1966)
- (19) GEROK, W.,
SICKINGER, K. Arzneimittel und Leber
S. 263-80, Schattauer Verlag,
Stuttgart (1975)
- (20) GÖTZ, H. Hepatotoxizität von Pyrrolidino-me-
thyltetracyclin bei gleichzeitiger
Gabe von Äthinylöstradiol bzw. Testo-
steronpropionat
Inaugural-Dissertation,

Medizinische Fakultät Erlangen (1982)

- (21) HANY, A.,
PETITE, J.,
ROBERT, M. La doxycycline en clinique
Chemotherapie 13. Suppl., S. 59-63,
Basel (1968)
- (22) HEIKEL, T.A.J.,
LATHE, G.H. The effect of oral contraceptive
steroids on bile secretion and bili-
rubin turn in rats
Br.J.Pharmac. 38:593-601(1970)
- (23) HOHLWEG, W.,
INHOFFEN, H.H. Klin.Wschr. 18, 3:77ff.(1939)
- (24) JAVITT, N.B. Clinical aspects of bile acid meta-
bolism
Schweiz.Med.Wschr. 98:269-72(1969)
- (25) KAPPAS, A.,
SONG, C.S.,
SASSA, S. The occurrence of substances in human
plasma capable of inducing the enzyme
delta-aminolevulinate synthetase in
liver cells
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 64:557-64(1969)
- (26) KERRY, J.B. et al. Fatty Liver induced by Tetracyclines
in the Rat
Gastroenterology 69:714-23(1975)
- (27) KIEF, H. Studien zur Morphologie des Neutral-
fettstoffwechsels und pathologische
Anatomie
Heft 14, Thieme Verlag, Stuttgart
(1967)

- (28) KNOTHE, H.,
DETTE, G. A. Antibiotika in der Klinik
S. 181-90, Aesopus Verlag, Basel -
München (1980)
- (29) KNOTHE, H. Tabellarium der Chemotherapie
S. 123-33, Aesopus Verlag, Basel -
München (1978)
- (30) KONTURRI, M.,
SOTANIEMI, E. Effect of estrogen on liver function
of prostatic cancer patients
Br. Med. J. 4:204ff. (1969)
- (31) KREEK, M. D.,
PETERSON, R. E.,
SLEISENGER, M. H. et al. Effects of ethinylestradiol-induced
cholestasis on bile flow and biliary
excretion of estradiol and estradiol-
glucuronide by the rat
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131:646-50
(1965)
- (32) KUNELIS, C. T.,
PETERS, J. L.,
EDMONDSON, H. A. Fatty Liver of Pregnancy and its
Relationship to Tetracycline Therapy
Am. J. Med. 38:359-77 (1965)
- (33) LANG, E. Antibiotika-Tabellen
5. Aufl., S. 21-28, Verlag Medizinische
Information, Wien (1981)
- (34) LAURITZEN, C. Oestrogene in Theorie und Praxis
S. 53-62, Herausgeber: Klinge Pharma
GmbH & Co., München (o. J.)
- (35) LEGLER, F. Kurzgefaßter Ratgeber für die chemo-
therapeutische Praxis
scripta medica merck (1979)

- (36) LEPPER, M.H. et al. Effects of a large dosage of aureo-
mycine on human liver
Arch.Int.Med. 88:427ff.(1961)
- (37) MAYWALD, M. Vergleichende Untersuchungen der
akuten Wirkung von Tetracyclin, Pyr-
rolidinomethyl-Tetracyclin und Doxy-
cyclin in steigenden Dosen auf den
Triglyzeridgehalt von Leber und Serum
männlicher Mäuse
Inaugural-Dissertation,
Medizinische Fakultät Erlangen (1981)
- (38) MORGAN, T., The effect of oxytetracycline and
RIBUSH, N. doxycycline on proteinmetabolism
Med.J.Australia 1:55-58(1972)
- (39) MÜLLER, M.N., Estrogen Pharmacology I
KAPPAS, A. The influence of estradiol and estriol
on the hepatic disposal of sulpho-
bromophthalein
J.clin.Invest. 43:1905ff.(1964)
- (40) NIKKILÄ, E.A., Measurement of plasma triglyceride
KEKKI, M. turnover in the study of hypertri-
glyceridemia
Scand.J.clin.Lab.Invest. 27:97-104
(1971)
- (41) N.N. Vibramycin^R
S. 99, Herausgeber: Pfizer GmbH,
Karlsruhe (o.J.)
- (42) N.N. Hormon-Therapie in der Praxis
2. Aufl., S. 23
Herausgeber: Schering AG, Verlag von

Erich Blaschker, Berlin (1953)

- (43) N.N. Z.klin. Chem.u.klin.Biochem.
8:658ff.(1970) u. 10:182ff.(1972)
- (44) OCKNER,R.K., Hepatic effects of oral contracepti-
DAVIDSON,C.S. ves
New Engl.J.Med. 276:381ff.(1967)
- (45) POPPER,H., Pathophysiology of Cholestasis
SCHAFFNER,F. Hum.Path., S. 1ff. (1970)
- (46) POPPER,H., Drug induced hepatic injury
SCHAFFNER,F. Ann.intern.Med. 51:1230-52(1959)
- (47) REUTER,E. Unerwünschte Wirkungen von Tetra-
cyclinen
Med.Klin.(München) 67:1256-61(1972)
- (48) RÖSCHLAU,P. et al. Z.klin.Chem.u.klin.Biochem.
12:403ff.(1974)
- (49) SCHACH V. WITTENAU,M. Some pharmacokinetic aspects of
doxycycline metabolism in man
Chemotherapy, Suppl. ad Vol. 13:41-50
(1968)
- (50) SCHACH V. WITTENAU,M., The distribution of tetracyclines in
DELAHUNT,C.S. tissues of dogs after repeated oral
administration
J.Pharmacol.Exper.Therap. 152:164-69
(1966)
- (51) SCHLIERF,G., Fettstoffwechsel
KAHLKE,W. in Siegenthaler,W.: Klinische Patho-
physiologie, 3. Aufl., S. 151-61,
Thieme Verlag, Stuttgart (1976)

- (52) SCHMIDT, E. u. F.W. Enzymologie
in Siegenthaler, W.: Klinische Patho-
physiologie, 3. Aufl., S. 177-95,
Thieme Verlag, Stuttgart (1976)
- (53) SCHRAMM, W. Über den Einfluß von Ethinylestradiol
auf die durch Tetracyclin verursach-
ten Veränderungen des Lebergewichts,
des Serumharnstoffes sowie der Trans-
aminasen und der alkalischen Phospha-
tase im Serum weiblicher Mäuse
Inaugural-Dissertation,
Medizinische Fakultät Erlangen (1983)
- (54) SCHLITZ, E.,
ADAMSON, J.S. jr.,
WORKMAN, W.W. et al. Fatal liver disease after intravenous
administration of tetracycline in
high dosage
New Engl.J.Med. 269:999-1004 (1963)
- (55) SHAUER, B.A.,
LUKACS, L.,
ZIMMERMAN, H.J. Biochemical indices of tetracycline
hepatic injury in rats
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 147:868-72
(1974)
- (56) SHEEHAN, H.L. Jaundice in pregnancy
Am.J.Obst.&Gynec. 81:427ff. (1961)
- (57) SPARANO, B.M. Sex Difference in Chlortetracycline-
induced Fatty Livers in Rats
Lab.Invest. 14/11:1931-38 (1965)
- (58) THORN, G.W.,
HARROP, G.A. "Sodium retaining effect" of sex
hormones
Science 86:40-41 (1937)

GmbH, documed,
S. 13, Frankfurt/M. (1980)

(66) WILSON, J.D.,
LINDSEY, C.A.

Studies on the influence of dietary
cholesterol on cholesterol metabolism
in the isotopic steady state of man
J.clin.Invest. 44:1805-14 (1965)

Herrn Prof. Dr. Estler danke ich für die
freundliche Überlassung des interessanten
Themas und die gewährte großzügige Unterstützung
bei der Durchführung dieser Arbeit

Lebenslauf:

13.10.1955	geboren als einziges Kind des Finanzamts- angestellten Max Schrader und der Hausfrau Sybilla Schrader, geb. Born, in Hof
1962 - 1966	Besuch der Christian-Wolfrum-Grundschule in Hof
1966 - 1975	Besuch des Schillergymnasiums in Hof (math.-nat. Zweig)
21.05.1975	Abiturprüfung, Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
01.07.1975 - 30.04.1976	Grundwehrdienst als Sanitäter in Regensburg und Amberg. Freistellung zum Medizinstudium
1976 - 1982	Studium der Humanmedizin an der Universität Erlangen-Nürnberg
11.10.1982	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung bestanden
18.10.1982	Approbation als Arzt
01.02.1983 - 30.06.1983	Grundwehrdienst als Stabsarzt, zunächst an der Sanitätsakademie der Bundeswehr in München

Mitgliedschaften im Verband Christlicher Pfadfinderinnen und Pfadfinder
(VCP) seit 1968 und in der Schülerverbindung Abituria O.R. zu Hof seit
1975.

